

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛЕГОЧНОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ ВАЗОПРЕССИНОВОЙ МОДЕЛИ ОТЕКА ЛЕГКИХ

Преображенский Н.Д., Порсева В.В.

Кафедра патологической физиологии, ФГБОУ ВО Ярославский государственный
медицинский университет Минздрава России, Россия, vvporseva@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Актуальность

Диагностическим и прогностическим маркером развития кардиогенной формы отека легких может служить повышенный уровень секреции вазопрессина, который коррелирует с высоким риском развития острой сердечной недостаточности.

Цель: изучение структурных изменений легочной ткани при системном введении синтетического аналога вазопрессина крысам.

Материал и методы

Взрослых самцов белых крыс разделили на контрольную (n=10) и опытную (n=10) группы.

В опыте вводили однократно внутривенно 0.01% раствора терлипрессина, в контроле – 0.9% раствор хлорида натрия. Через 50 минут после введения препаратов из ткани каудальной доли левого легкого готовили срезы, окрашивали гематоксилин-эозином.

Изображения срезов получали с помощью микроскопа Olympus BX43, морфометрию выполняли в Image J (NIH, США).

Измеряли участки с неизменной и измененной паренхимой, как их отношение к общей исследуемой площади среза, размер входа в альвеолу (ВА), площадь альвеол (ПА), максимальный и минимальный диаметр альвеол (макс и мин ДА), толщину межальвеолярных перегородок (ТМП). Обработку данных проводили с использованием программы Statistica.

Результаты

В контроле гистоархитектоника легкого без изменений, ТМП $5,17 \pm 0,15$ мкм, ВА $9,57 \pm 0,47$ мкм. В опыте гистоархитектоника легкого неоднородна: альвеолы с отеочной жидкостью ($13,82 \pm 1,12\%$) и без нее ($9,16 \pm 1,12\%$), интерстициальный отек ($77,02 \pm 1,12\%$).

После введения терлипрессина ВА уменьшался, а ТМП увеличивалась в 2 раза, макс и мин ДА уменьшались в 1,3 и 1,6 раза соответственно, средняя ПА уменьшалась в 1,7 раза. Морфометрический анализ верифицировал макроскопическую картину легочного отека.

Заключение

Уменьшение воздушности альвеолярного пространства легких в сочетании с выраженным увеличением интерстициального пространства легких у крыс предполагает гемодинамический генез отека легких при системном введении терлипрессина.

Ключевые слова: легочный отек, гистоморфометрия, терлипрессин, крыса.

ABSTRACT

MORPHOLOGICAL CHANGES OF LUNG TISSUE IN THE CONDITIONS OF THE VASOPRESSIN-INDUCED MODEL OF PULMONARY EDEMA

Background

Elevated vasopressin secretion is a diagnostic and prognostic marker for cardiogenic pulmonary edema, correlating with a high risk of acute heart failure.

Objective

To study lung tissue structural changes after systemic administration of synthetic vasopressin analog in rats.

Material and methods

Adult male white rats were divided into control (n=10) and experimental (n=10) groups.

The experimental group received a single intravenous injection of 0.01% terlipressin solution, while controls received 0.9% sodium chloride.

Lung tissue sections from the left caudal lobe were prepared 50 minutes later, stained with hematoxylin-eosin. Images of the sections were obtained using an Olympus BX43 microscope, and morphometrically analyzed with ImageJ.

Measurements included unaffected and affected parenchyma areas, alveolar entrance size (AE), alveolar area (AA), maximum and minimum alveolar diameters (max and min AD), and interalveolar septa thickness (IST). Data were processed using Statistica.

Results

Control lungs showed normal histoarchitecture: IST $5.17 \pm 0.15 \mu\text{m}$, AE $9.57 \pm 0.47 \mu\text{m}$. Experimental lungs were heterogeneous, with edematous alveoli ($13.82 \pm 1.12\%$), non-edematous alveoli ($9.16 \pm 1.12\%$), and interstitial edema ($77.02 \pm 1.12\%$).

Terlipressin reduced AE and increased IST by two times, decreased max and min alveolar diameters by 1.3 and 1.6 times, and decreased AA 1.7 times. Morphometry confirmed pulmonary edema morphology.

Conclusions

Reduction of alveolar airspace volume combined with a pronounced increase of interstitial lung space in rats suggests a hemodynamic origin of pulmonary edema during systemic terlipressin administration.

Key words: pulmonary edema, histomorphometry, terlipressin, rat.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Одной из актуальных задач экспериментальной патофизиологии является разработка и совершенствование воспроизводимых и клинически сопоставимых моделей отека легких (ОЛ), позволяющих изучить патогенетические механизмы его развития.

В решении этой задачи одну из ключевых ролей играет методологический подход, позволяющий провести детальный анализ структурных изменений, развивающихся в легочной ткани при патологии, и предполагает использование гистологического метода с морфометрическим анализом.

Для воспроизведения кардиогенного отека легких (КОЛ) у различных млекопитающих применяют модели с системным введением агонистов адренорецепторов [1, 2, 3, 4].

Катехоламины, в частности адреналин и норадреналин, а также мезатон, реализуют положительные хроно-, ино-, дромо- и батмотропные эффекты, тем самым модулируя адренореактивность сердца. При этом, степень гидратации и кровенаполнения легких определяется рецепторной модуляцией применяемого вазопрессора.

Помимо применения агонистов адренорецепторов для моделирования КОЛ у крыс использовалось болюсное введение вазопрессина, что также сопровождалось развитием выраженного легочного отека [5, 6].

Диагностическим и прогностическим маркером развития КОЛ может служить повышенный уровень секреции вазопрессина [7], который коррелирует с высоким риском развития острой сердечной недостаточности [8].

Цель исследования состояла в изучении морфологических изменений легочной ткани при системном введении синтетического аналога вазопрессина крысам в условиях моделирования отека легких.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на взрослых самцах белых крыс с массой 220 ± 40 г. Животных разделили на две группы: контрольную ($n=10$) и опытную ($n=10$).

Эксперименты одобрены Этическим комитетом ФГБОУ ВО ЯГМУ МЗ России (протокол №69 от 13.09.2024 г.).

Всех животных наркотизировали однократно интраперитонеально раствором нембутала (40 мг/кг).

В опытной группе моделировали ОЛ путем введения однократно внутривенно 0.01% раствора терлипрессина (1 мл/кг (0.1 мг/кг), ООО Фирма «ФЕРМЕНТ», г. Москва, Россия).

Контрольной группе вводили однократно внутривенно 0.9% раствор хлорида натрия (1 мл/кг, ОАО НПК «ЭСКОМ», г. Ставрополь, Россия). Через 50 минут после введения препаратов у всех животных выполняли двустороннюю боковую торакотомию с последующей экстирпацией легких.

Гистологические срезы готовили из ткани каудальной доли левого легкого, которую фиксировали в 10% нейтральном формалине (на основе 0.01 М фосфатно-солевого буфера, pH 7.4; ООО «БиолоТ», г. Санкт-Петербург, Россия) при температуре 37°C в течение 24 часов. После чего кусочки ткани легкого промывали под проточной водой в течение 10 минут.

Парафинизацию образцов ткани выполняли ступенчато, проводкой через ацетон (ООО «Компонент-Реактив», г. Москва, Россия) и ксилол (ООО «Торговый Дом «Балтийский Берег», г. Санкт-Петербург, Россия) с последующим заключением в парафин для гистологической заливки тканей «ГИСТОМИКС»

(ООО «ЭргоПродакшн», г. Санкт-Петербург, Россия) при 60°C с трехкратной заменой последней. Готовили гистологические срезы толщиной 5 мкм с помощью микротомы МЗП-01 Техном (ООО «КБ ТЕХНОМ», г. Екатеринбург, Россия).

Окраску срезов проводили гематоксилин-эозином после депарафинизации.

Окрашенные срезы заключали в монтирующую среду «Витрогель» (ООО «ЭргоПродакшн», г. Санкт-Петербург, Россия) с предварительной проводкой в этаноле возрастающей концентрации и ксилоле.

Цифровые изображения гистологических препаратов получали с помощью микроскопа Olympus BX43 (Токио, Япония) и цифровой CCD камерой Tucsen TCC 6.1ICE с программным обеспечением ISCapture 3.6 (Китай). Последующую морфометрию и анализ изображений проводили в программе Image J (НИН, США).

На цифровых изображениях гистологических срезов при увеличении $\times 10$ измеряли участки с неизменной и измененной (интерстициальный отек, альвеолярный отек) паренхимой, относительное содержание которых вычисляли, как их отношение к общей исследуемой площади среза.

При увеличении $\times 20$ измеряли размер входа в альвеолу, площадь альвеол, максимальный и минимальный диаметр альвеол, толщину межальвеолярных перегородок.

Обработку данных проводили с использованием программы Statistica, версия 12 (StatSoft, Inc., 2013, США).

Полученные данные представлены в виде среднего значения и его стандартной ошибки, для детального поиска различий применяли однофакторный дисперсионный анализ вариаций ANOVA и критерий Тьюки Post-hoc анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У животных опытной группы при макроскопии легкие увеличены в размерах, интенсивного темного багрового цвета, ткань легких податлива, из просвета трахеи выделяется розовая пенная жидкость.

В контрольной группе животных ткань легких эластична, без видимых изменений.

Микроскопически у крыс контрольной группы гистоархитектоника легкого сохранена, $96.82 \pm 0.01\%$ паренхимы без изменений. Толщина межальвеолярных перегородок составляет $5,17 \pm 0,15$ мкм, размер входа в альвеолы – $9,57 \pm 0,47$ мкм.

В опытной группе гистоархитектоника легкого неоднородна, определяются диффузные изменения в виде отека интерстициальной ($77.02 \pm 1.12\%$) и альвеолярной ткани ($13.82 \pm 1.12\%$), часть альвеол не содержала отечной жидкости ($9.16 \pm 1.12\%$). В областях паренхимы легкого прилегающих к плевре наблюдается диapedез эритроцитов, часть которых гемолизированы.

В опытной группе у животных размер входа в альвеолы уменьшалась до $4,68 \pm 0,28$ мкм, а толщина межальвеолярных перегородок увеличивалась до $10,11 \pm 0,44$ мкм ($p < 0,05$). В опытной группе у животных средние размеры альвеол, не содержащих отечной жидкости, имели максимальный – $16,07 \pm 0,61$ мкм и минимальный – $9,40 \pm 0,55$ мкм диаметры (в контрольной группе соответственно – $20,75 \pm 0,58$ и $14,75 \pm 0,29$ мкм). При этом средняя площадь альвеол в опытной группе была значимо меньше, чем в контроле в 1,7 раза и составила $129,93 \pm 11,08$ мкм².

Таким образом, морфометрический анализ верифицировал макроскопическую картину легочного отека у крыс на фоне введения синтетического аналога вазопрессина – терлипессина.

Увеличение толщины межальвеолярных перегородок, уменьшение расстояния входа в альвеолы, уменьшение средних размеров альвеол (диаметр, площадь) связано с утолщением интерстициального пространства за счет накопления жидкости, то есть сформировалась интерстициальная форма ОЛ (ИОЛ).

Очевидно, развитие ИОЛ реализуется через активацию V1a (сосудистые) рецепторов, локализованных в гладких мышцах сосудов, кардиомиоцитах [9, 10, 11], что приводит к вазоконстрикции и повышению системного сосудистого сопротивления.

Установлено, что физиологические уровни секреции вазопрессина не оказывают существенного влияния на изменения сосудистого тонуса, а инфузии экзогенного вазопрессина увеличивают системное сосудистое сопротивление и повышают давление заклинивания легочных капилляров с дозозависимым уменьшением ударного объема и сердечного выброса [12].

Терлипрессин как и вазопрессин является неспецифическим агонистом вазопрессиновых рецепторов. Активация V2 (почечные) рецепторов приводит к увеличению объема циркулирующей крови путем аквапорин-опосредованной реабсорбции воды в дистальных канальцах и собирательных трубках нефрона [10, 11], что также повышает системное сосудистое сопротивление и способствует развитию ОЛ, и предполагает патогенетическое участие вазопрессина в формировании уже порочных кругов КОЛ.

Интерстиций представляет собой ограниченное пространство между альвеолярным эпителием и базальными мембранами капиллярного эндотелия, содержит клетки и внеклеточную сеть эластичных волокон и пучков коллагеновых фибрилл, образующих волокна [13].

Наиболее многочисленными клетками в интерстиции являются миофибробласты, которые ориентированы поперек межальвеолярной перегородки, тем самым укрепляя интерстициальное пространство. Однако, через поры в базальной мембране миофибробласты способны напрямую связывать альвеолярный эпителий и эндотелий капилляров.

Установлено, что у взрослых крыс плотность интерстициальных клеток составляет 35,8% от объема легочной ткани, интерстициального пространства – 11,6% [14].

После введения терлипрессина доля интерстициального пространства от площади всей паренхимы легочной ткани превышала 75%, что предполагает первичное нарушение тонуса сосудов малого круга кровообращения с повышением гидростатического давления в легочных венулах и капиллярах вследствие возрастания сопротивления системных сосудов.

ВЫВОДЫ

Уменьшение воздушности альвеолярного пространства легких в сочетании с выраженным увеличением интерстициального пространства легких у крыс предполагает гемодинамический генез отека легких при системном введении терлипрессина.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Ярославской области в рамках научного проекта (N28НП/2024)

ЛИТЕРАТУРА

1. Кобзарь Н.Е., Михайлов В.П., Преображенский Н.Д., Порсева В.В. Влияние метил- β -циклодекстрина и его комплекса с холестерином на показатели гидратации легких и осмотической резистентности эритроцитов при экспериментальном моделировании отека легких. Патогенез, 2023. Т. 21, №2. С. 25-30. DOI: 10.25557/2310-0435.2023.02.25-30.
2. Копылова С.В., Жакет Э. Иммунометаболический статус крыс при моно-КВЧ-терапии отека легких. Журнал медико-биологических исследований. 2024. Т. 12. №1. С. 16-23. DOI: 10.37482/2687-1491-Z172.
3. Rassler B. Contribution of α – and β -Adrenergic Mechanisms to the Development of Pulmonary Edema. Scientifica (Cairo). 2012:829504. DOI: 10.6064/2012/829504.
4. Abouelfetouh M.M., Salah E., Ding M., Ding Y. Application of $\alpha 2$ -adrenergic agonists combined with anesthetics and their implication in pulmonary intravascular macrophages-insulted pulmonary edema and hypoxemia in ruminants. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 2021. 44(4):478-502. DOI: 10.1111/jvp.12960.
5. Lagneaux D., Lecomte J. Mécanismes pathogéniques de l'oedème pulmonaire aigu d'origine hémodynamique chez le rat [Pathogenic mechanisms of acute pulmonary edema of hemodynamic origin in rats]. C R Seances Soc Biol Fil. 1991. 185(5):324-30.
6. Михайлов В.П. Патогенез отека легких. Ярославль, 2002. 43 с.
7. Mu D., Cheng J., Qiu L., Cheng X. Copeptin as a Diagnostic and Prognostic Biomarker in Cardiovascular Diseases. Frontiers in Cardiovascular Medicine. 2022. 9:901990. DOI:10.3389/fcvm.2022.901990.
8. Алиева А.М., Алмазова И.И., Пинчук Т.В., Резник Е.В., Федулаев Ю.Н., Никитин И.Г. Значение копептина в диагностике и прогнозе течения сердечно-сосудистых заболеваний. Клиническая медицина. 2020. Т. 98. №3. С. 203-209. DOI:10.30629/0023-2149-2020-98-3-203-209.
9. Pelletier J.S., Dicken B., Bigam D., Cheung P.Y. Cardiac effects of vasopressin. Journal of Cardiovascular Pharmacology. 2014. 64(1):100-107. DOI:10.1097/FJC.0000000000000092.
10. Szczepanska-Sadowska E., Zera T., Sosnowski P., Cudnoch-Jedrzejewska A., Puszek A., Misicka A. Vasopres-

- sin and Related Peptides; Potential Value in Diagnosis, Prognosis and Treatment of Clinical Disorders. *Current Drug Metabolism*. 2017. 18(4):306-345. DOI:10.2174/1389200218666170119145900.
11. Japundžić-Žigon N., Lozić M., Šarenac O., Murphy D. Vasopressin & Oxytocin in Control of the Cardiovascular System: An Updated Review. *Current Neuropharmacology*. 2020. 18(1):14-33. DOI:10.2174/1570159X17666190717150501.
 12. Finley J.J. IV, Konstam M.A., Udelson J.E. Arginine vasopressin antagonists for the treatment of heart failure and hyponatremia. *Circulation*. 2008. 118(4):410-21. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.765289.
 13. Knudsen L, Ochs M. The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components. *Histochemistry and Cell Biology*. 2018. 150(6):661-676. DOI: 10.1007/s00418-018-1747-9.
 14. Haies DM, Gil J, Weibel ER. Morphometric study of rat lung cells. I. Numerical and dimensional characteristics of parenchymal cell population. *American Review of Respiratory Disease*. 1981. 123(5):533-41. DOI: 10.1164/arrd.1981.123.5.533.